

091 719336 A5



AA

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

17 Patentschrift
10 DE 44 44 949 C 1

51 Int. Cl.⁶:
C 12 N 15/79
C 12 N 15/54
C 12 N 7/00
A 61 K 48/00

21 Aktenzeichen: P 44 44 949.6-41
22 Anmeldetag: 16. 12. 94
23 Offenlegungstag: —
25 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 21. 11. 96

DE 44 44 949 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

13 Patentinhaber:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69126 Heidelberg, DE

24 Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

72 Erfinder:
Bürkle, Alexander, Dr., 69181 Leimen, DE; Köpper,
Jan-Heiner, Dr., 69256 Mauer, DE; zur Hausen,
Harald, Prof. Dr.med.Drs.h.c., 69493 Hirschberg, DE

68 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
J. Biol. Chem. 265, S. 18721-18724, 1990;
Strategies for expressing analogs of poly
(ADP-ribose) polymerase in eukaryotic cells;
KANG, Veronica;
HAQUE, Saikh J.;
Cherney, Barry;
Smulson, Mark;
Sch. Med., Georgetown Univ., Washington, DC,
20007, USA, ADP-Ribosylation React. (1992), 72-6
Editor(s): Poirier, Guy G.;
Moreau, Pierre. Publisher: Springer, New York, N. Y.,
Codon: 58RSAM;

64 Vektoren und Viren zur Gentherapie

67 Die vorliegende Erfindung betrifft einen zur Gentherapie
geeigneten Vektor, der eine exprimierbare Insert-DNA um-
faßt, die für die DNA-Bindungsdomäne einer Poly(ADP-Ri-
bose)-Polymerase oder für eine zumindest teilweise kataly-
tisch nicht-aktive Poly(ADP-Ribose)-Polymerase codiert.
Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung eines
solchen Vektors und Viren, die zur Gentherapie geeignet
sind.

DE 44 44 949 C 1

Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren und Viren, die sich zur Genterapie eignen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Eine gängige Tumorthherapie umfaßt die operative Entfernung des Tumors und die Nachbehandlung des Patienten mittels Bestrahlung und/oder systemischer Applikation von Zytostatika. Durch die Nachbehandlung wird versucht, nicht entfernbares Tumorgewebe bzw. gebildete Metastasen abzutöten.

Der Erfolg gängiger Tumorthérapien ist allerdings gering. Insbesondere treten bei den nachbehandelten Patienten häufig Nebenwirkungen, wie Induktion von Zweitumoren, Schädigungen innerer Organe oder Schmerzen, auf.

Küpper et al. [The Journal of Biological Chemistry, Bd. 265, Nr. 31, S. 18721—18724 (1990)] beschreiben Expressionskonstrukte (pPARP 51 und pPARP 62), welche u. a. die DNA-Bindungsdomäne der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) enthalten. Diese Expressionskonstrukte sind jedoch für die Genterapie ungeeignet, da sie auf SV40-Vektoren basieren.

Kang et al. [in: ADP-Ribosylation Reactions, Poirier und Moreau (Herausgeber), Springer Verlag (1992)] beschreiben Expressionsplasmide, welche die DNA-Bindungsdomäne und Teile der Automodifikationsdomäne der PARP enthalten. Auch diese Vektoren basieren auf SV40, was sie zur Genterapie ungeeignet macht.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem gängige Tumorthérapien verbessert und insbesondere vorstehende Nebenwirkungen vermieden werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch einen zur Genterapie geeigneten Vektor erreicht, der eine exprimierbare Insert-DNA umfaßt, die für die DNA-Bindungsdomäne (nachstehend mit DBD) einer Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (nachstehend mit PARP) oder für eine zumindest teilweise katalytisch nicht-aktive PARP codiert.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß PARP, ein zur Reparatur von DNA-Schädigungen benötigtes Enzym, durch Zugabe von DBD-Molekülen in seiner Aktivität gehemmt wird und die Reparatur von DNA-Schädigungen drastisch in ihrer Geschwindigkeit vermindert wird.

Der vorstehende Ausdruck "zur Genterapie geeigneter Vektor" umfaßt jegliche Vektoren, die alleine oder zusammen mit anderen Mitteln in der Genterapie verwendet werden können. Dies sind z. B. Plasmid-Vektoren und Virus-Vektoren. Von letzteren sind insbesondere solche von Adenovirus, Herpes Simplex Virus, Adenoassoziertes Virus (nachstehend mit AAV bezeichnet), "Minute virus of mice" (nachstehend mit MVM bezeichnet) und Retroviren zu nennen. Ganz besonders bevorzugt werden Virus-Vektoren von AAV, z. B. AAV-sub201 (vgl. Samulski, R. J. et al., J. Virology 51, (1987), 3086—3101) von MVM z. B. pSR2 (vgl. Russell, S. J. et al., J. Virology 66, (1992), 2821—2828) und von Retroviren, z. B. N2 (vgl. Keller, G. et al., Nature 318, (1985), 149—154).

Erfindungsgemäß wird in einen vorstehenden Vektor eine Insert-DNA eingefügt, die für die DBD einer PARP oder für eine zumindest teilweise katalytisch nicht-aktive PARP codiert. Eine vorstehende Insert-DNA kann aus einem beliebigen Organismus, z. B. dem Menschen oder dem Tier oder aus Pflanzen, stammen. Vorzugsweise wird eine Insert-DNA aus dem Menschen und

besonders bevorzugt jene von Fig. 1, Position — 29 bis +1127, oder eine durch ein oder mehrere Nukleotide davon unterschiedliche DNA-Insert-DNA.

Die Einfügung vorstehender Insert-DNA in den Vektor erfolgt derart, daß die Insert-DNA exprimiert werden kann. Dies kann erreicht werden, indem die Insert-DNA in eine im Vektor vorhandene Expressionseinheit in Phase inseriert wird. Dazu kann es notwendig sein, eine in der Expressionseinheit vorliegende DNA zumindest teilweise zu entfernen. Auch kann es vorteilhaft sein, Elemente der vorhandenen Expressionseinheit, wie Enhancer, Promotor oder Polyadenylierungssignale, zu entfernen oder durch andere zu ersetzen. Vorzugsweise wird in eine Expressionseinheit ein Promotor eingefügt, der spezifisch für eine Gewebe-Art ist, wodurch die Expression der unter der Kontrolle des Promotors stehenden Insert-DNA gewebspezifisch wird. Besonders bevorzugt ist ein Promotor, der in Tumorzellen aktiv ist. Ein Beispiel eines solchen Promotors ist der P4-Promotor von MVM (vgl. Russell, S. J. et al., vorstehend).

Die Expression vorstehender Insert-DNA kann ferner in einer Expressionseinheit erreicht werden, die hierzu in den Vektor eingeführt werden muß. Für diese Expressionseinheit gelten auch die vorstehenden Ausführungen.

Im Falle von Virus-Vektoren erweist es sich oftmals als günstig, die Insert-DNA in eine im Vektor vorhandene Expressionseinheit einzufügen. Die hiermit u. U. verbundene Entfernung oder Teilentfernung von in der Expressionseinheit vorliegender: Virus-DNA führt dann zu einem Virus-Vektor, der in einer Virus-Funktion einen Defekt aufweist. Dieser Defekt kann als Selektionsmarker genutzt werden. Andererseits kann der Defekt, wenn nötig, durch übliche Verfahren, wie Komplementation in trans, ausgeglichen werden.

Erfindungsgemäß werden Virus-Vektoren bevorzugt, in denen die Insert-DNA so eingefügt ist, daß die Virus-Vektoren alleine nicht mehr zur Bildung der durch sie codierten Viren in der Lage sind. Beispiele solcher Virus-Vektoren sind in den Fig. 2 und 3 angegeben. Es handelt sich um AAV^{rep}-DBD, MVM^{rep}-DBD und AAV^{rep/csp}-DBD (Fig. 2). Durch übliche Komplementationsverfahren können allerdings die durch sie codierten Viren gebildet werden. Beispielsweise wird AAV^{rep}-DBD in Zellen transfiziert, die gleichzeitig mit einem das rep-Gen exprimierenden DNA-Konstrukt cotransfiziert sind. Es werden Viren erhalten. Diese eignen sich gut zur Genterapie, da sie sich im Patienten nicht vermehren können.

Ferner weist Fig. 3 auf den bevorzugten Retrovirus DBD-Vektor hin. Durch Transfektion in eine übliche Packaging-Zelllinie wird das durch den Virus-Vektor codierte Virus erhalten. Dieses eignet sich ebenfalls gut zur Genterapie.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit auch Viren, die durch vorstehende Virus-Vektoren codiert werden.

Erfindungsgemäße Vektoren und Viren zeichnen sich dadurch aus, daß sie die Reparatur von DNA-Schäden hemmen können. Sie eignen sich daher besonders, in Therapien eingesetzt zu werden, in denen Zellen abgetötet werden sollen. Ganz besonders ist die Eignung der erfindungsgemäßen Vektoren und Viren in der Behandlung von Tumoren, insbesondere zusammen mit konventionellen Bestrahlungs- und/oder Zytostatika-Verfahren, zu sehen. Hierbei schlägt besonders zu Buche, daß sie gewebe(tumor)-spezifisch aktiv sein können. Die vorlie-

gende Erfindung ist richtungsweisend für die gentherapeutische Behandlung schwerster Erkrankungen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt eine DNA, die zwischen den Positionen -29 und +1127 für die DBD einer humanen PARP codiert.

Fig. 2 zeigt die erfindungsgemäßen Vektoren AAV^{rep}-DBP, MVM^{cap}-DBD und AAV^{rep/cap}-DBD, und

Fig. 3 zeigt den erfindungsgemäßen Retrovirus-DBD-Vektor.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Beispiel 1

Herstellung des erfindungsgemäßen Vektors AAV^{rep}-DBD

Es wird von dem Vektor AAV-sub201 (Samulski, R.J. et al., vorstehend) ausgegangen. Dieser Vektor wird mit den Restriktionsenzymen XbaI und BstBI gespalten. Es werden ein 3,3 kb Vektor-Fragment und ein 1,4 kb Rep-Fragment erhalten. Letzteres erstreckt sich bis an das 5'-Ende des p40-Promotors und wird verworfen. Die Enden des Vektor-Fragments werden "geglättet". In dieses wird ein Insert, P4-DBD-poly A, eingefügt, das von 5' nach 3' folgende Sequenzen umfaßt: (I) ein 259 bp BamHI/NcoI-Fragment, das den P4-Promotor enthält. Dieses Fragment stammt z. B. aus dem Plasmid pEG618 (vgl. Astell, C. et al., J. Virology 57, (1986), 656—669); (II) ein 1,73 kb EcoRI/HindIII-Fragment aus pPARP6 (vgl. Küpper, J.H. et al., J. Biol. Chem. 265 (1990), 18721—18724), das sowohl die 1,1 kb DBD als auch das 630 bp HSV-Thymidinkinase Poly-A-Signal aufweist. Es wird der Vektor AAV^{rep}-DBD erhalten.

Beispiel 2

Herstellung des erfindungsgemäßen Vektors MVM^{cap}-DBD

Es wird von dem Vektor pSR2 (vgl. Russell, S.J. et al., vorstehend) ausgegangen. Dieser Vektor wird mit HindIII und BglII gespalten. Es werden ein Vektor-Fragment und ein 1,6 kb Capsid-Fragment (II) von MVM erhalten. Letzteres Fragment wird entfernt und durch das Insert-Fragment (II) von Beispiel 1, DBD-Poly-A, ersetzt. Es wird der Vektor MVM^{cap}-DBD erhalten.

Beispiel 3

Herstellung des erfindungsgemäßen Vektors AAV^{rep/cap}-DBD

Es wird von dem Vektor AAV-sub201 von Beispiel 1 ausgegangen. Dieser Vektor wird mit XbaI gespalten und sämtliche AAV-Bestandteile außer den terminalen Reiterationen werden entfernt. Das restliche Fragment wird mit der intermediären Sequenz, z. B. einem 24 kb BamHI/BamHI-Fragment aus pCosAgy2 (vgl. Auer, B. et al., DNA 8 (1989), 575—580), welches nicht-codierende Sequenzen aus dem 7. Intron der humanen PARP aufweist, ligiert. Danach werden die Fragmente I und II aus Beispiel 1 eingefügt. Es wird der Vektor AAV^{rep/cap}-DBD erhalten.

Beispiel 4

Herstellung des erfindungsgemäßen Retrovirus-DBD-Vektors

Es wird von dem Vektor N2 (vgl. Keller, G. et al., vorstehend) ausgegangen. Dieser Vektor wird mit EcoRI-Partialverdau 3' des Neomycin-Gen geöffnet. In den Vektor werden dann von 5, nach 3' folgende Sequenzen am 3'-Ende des Neomycin-Gens inseriert: (I) das 0,7 kb poly-A-Signal des β -Globin-Gens (z. B. das EcoRI/SalI-Fragment aus pECV; vgl. Berg, B.G.M. et al., Gene 4 (1989), 407—417); (II) ein 259 bp BamHI/NcoI-Fragment, das den P4-Promotor enthält (vgl. Beispiel 1, (I)); (III) ein 1,73 kb EcoRI/HindIII-Fragment aus pPARP6 (vgl. Beispiel 1, (II)). Es wird der Retrovirus-DBD-Vektor erhalten.

Beispiel 5

Hemmung der Reparatur von DNA-Schäden

Die Hemmung der Reparatur von DNA-Schäden wird anhand der Hemmung der Synthese von Poly(ADP-Ribose) gezeigt. Der erfindungsgemäße Vektor AAV^{rep}-DBD wird durch Elektroporation in HeLa-Zellen transfiziert. Nach der Transfektion werden die Zellen auf Deckgläschen für die Mikroskopie ausgesät. Zwei Tage später werden die transfizierten Zellen auf den Deckgläschen einer genotoxischen Behandlung, z. B. Röntgenbestrahlung oder Behandlung mit alkylierenden Kanzerogenen, unterzogen. Dadurch entstehen DNA-Brüche, die zu einer Aktivierung der PARP führen, die dann Poly(ADP-Ribose) synthetisiert. Innerhalb von 30 min nach der genotoxischen Behandlung werden die HeLa-Zellen mit Trichloressigsäure fixiert und einer indirekten Immunfluoreszenz gegen Poly(ADP-Ribose) unterzogen. Es werden keine Poly(ADP-Ribose)-spezifischen Signale erhalten.

Dies zeigt, daß die in Zellen exprimierte DBD eine Hemmung der PARP verursacht.

Patentanprüche

1. Vektor mit einer exprimierbaren Insert-DNA, die für die DNA-Bindungsdomäne einer Poly(ADP-Ribose)-Polymerase oder für eine zumindest teilweise katalytisch nicht-aktive Poly(ADP-Ribose)-Polymerase codiert, wobei der Vektor zur Gentherapie geeignet ist.
2. Vektor nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor auf einem Virus-Vektor beruht.
3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Virus-Vektor ein Adeno-assoziiertes Virus, ein Maus-Minute Virus- oder ein Retrovirus-Vektor ist.
4. Vektor nach einem der Ansprüche 1—3, dadurch gekennzeichnet, daß die für die DNA-Bindungsdomäne codierende DNA die Sequenz von Fig. 1 zwischen den Positionen -29 und +1127 oder eine durch ein oder mehrere Nukleotide davon unterschiedliche Sequenz aufweist, wobei Fig. 1 Bestandteil dieses Anspruchs ist.
5. Vektor nach einem der Ansprüche 1—4, dadurch gekennzeichnet, daß die Insert-DNA in einem Tumor exprimierbar ist.
6. Verfahren zur Herstellung des Vektors nach Anspruch 1, umfassend die Einfügung der Insert-DNA

nach Anspruch 1 in einen Vektor, der zur Gentherapie geeignet ist, derart, daß eine Expression der Insert-DNA durch eine bereits im Vektor vorhandene oder ebenfalls inserierte Expressionseinheit erfolgen kann.

7. Virus, codiert durch den Vektor nach Anspruch 2 oder 3.

8. Verwendung des Virus nach Anspruch 7 zur Gentherapie.

9. Verwendung nach Anspruch 8 bei Tumorerkrankungen.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

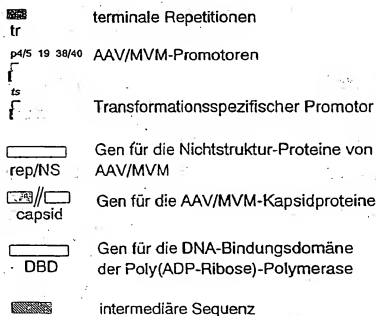
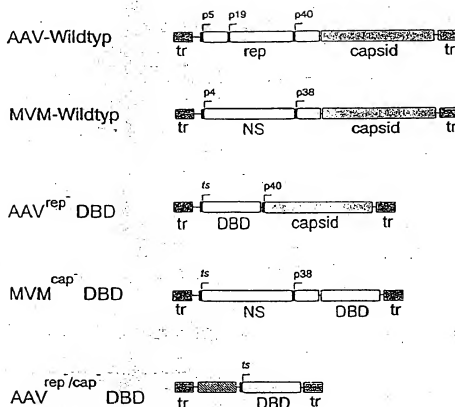


FIG. 2 Erfindungsgemäße Vektoren AAV^{rep}-DBD, MVM^{cap}-DBD, AAV^{rep/cap}-DBD

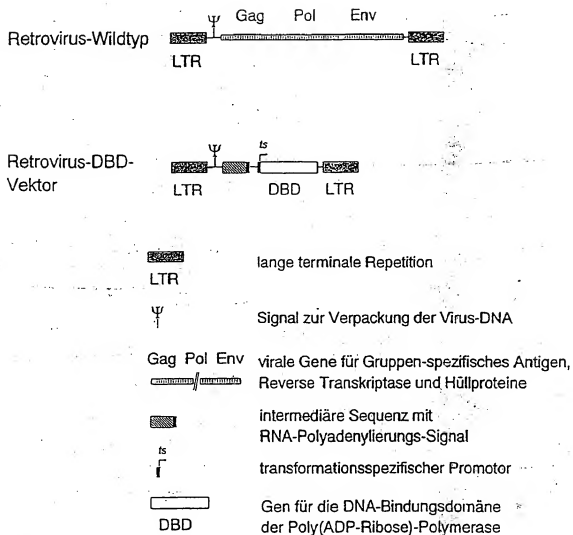


FIG. 3 Erfindungsgemäßer Retrovirus-DBD-Vektor